

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-166541
(P2000-166541A)

(43) 公開日 平成12年6月20日 (2000.6.20)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 5/06		C 1 2 N 5/00	E 4 B 0 2 9
B 0 1 D 39/14		B 0 1 D 39/14	B 4 B 0 6 6
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 D 0 1 9
1/12		1/12	

審査請求 未請求 請求項の数3 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平10-358385	(71) 出願人	000123369 学校法人東海大学 東京都渋谷区富ヶ谷2丁目28番4号
(22) 出願日	平成10年12月3日 (1998.12.3)	(71) 出願人	000116806 旭メディカル株式会社 東京都千代田区神田美土代町9番地1
		(72) 発明者	加藤 俊一 東京都渋谷区富ヶ谷2丁目28番地4号 学 校法人 東海大学内
		(74) 代理人	100068238 弁理士 清水 猛 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト未分化造血幹細胞およびその分離方法ならびに分離装置

(57) 【要約】

【課題】 安価、短時間の簡便な操作で、ヒト未分化造血幹細胞を得ることができる分離方法および装置を提供する。

【解決手段】 有核細胞を実質的に捕捉し、赤血球を実質的に通過するフィルターにヒト未分化造血幹細胞含有液を導入し、次に、該フィルターに液体を導入して、フィルターに捕捉されているヒト未分化造血細胞を回収する。

(2) 000-166541 (P2000-166541A)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 有核細胞を実質的に捕捉し、赤血球を実質的に通過するフィルターから回収された、CD45抗原陽性かつCD34抗原陰性かつ分化抗原陰性のヒト未分化造血幹細胞。

【請求項2】 有核細胞を実質的に捕捉し、赤血球を実質的に通過するフィルターにCD45抗原陽性かつCD34陰性かつ分化抗原陰性の有核細胞を含む有核細胞含有液を導入し、次に該フィルターに液体を導入して該フィルターに捕捉されているCD45抗原陽性かつCD34抗原陰性かつ分化抗原陰性の有核細胞を回収することを特徴とするヒト未分化造血幹細胞の分離方法。

【請求項3】 CD45抗原陽性かつCD34抗原陰性かつ分化系統陰性のヒト未分化造血幹細胞を分離回収する装置であって、液体流入口と液体流出口を有する容器に多孔質構造体からなる有核細胞捕捉材が充填されたフィルターであることを特徴とするヒト未分化造血幹細胞分離装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒトの未分化造血幹細胞および該細胞を分離する方法ならびに分離装置に関する。得られたヒト未分化造血幹細胞は、造血幹細胞移植療法等、細胞を用いて行う各種疾病の治療および免疫学や細胞生物学等の基礎科学分野で用いることが可能となる。

【0002】

【従来の技術】従来、ヒト造血幹細胞の表面マーカーとしては、CD34抗原が一般に知られており、CD34抗原陽性細胞集団の中でも、CD38抗原陰性かつ分化抗原陰性細胞がより未分化とされていた（特開平5-76354）。ところが、近年、マウスではCD34陰性細胞がより未分化であるという報告が相次ぎ（例えば、第57回日本血液学会総会、演題番号490、1995年）、また、さらに最近では、ヒトにおいてもより未分化な造血幹細胞はCD34陰性であるという報告が散見されるようになった（例えば、Goodell, et al: Nature Medicine, vol. 3, No. 12, 1997; Zanjani, et al: Exp. Hematol. vol. 26, 1998）。これらの報告では、CD34抗原陰性細胞（より詳細にはCD45抗原陽性かつCD34抗原陰性かつ分化抗原陰性、以下、CD45⁺CD34⁻Lin⁻と略す）の分離には、特殊なセルソーティング装置と特殊な蛍光染料および/または数多くのモノクローナル抗体を用いており、多大なコスト、時間を要し、かつ操作も非常に煩雑なもので、実用レベルからはほど遠いものであった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、安価、短時間の簡便な操作で、ヒト未分化造血幹細胞を得られる方

法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、かかる問題点を解決するため鋭意検討を行った。ここで、本発明者らは、当該分野での常套手段であり前述の先行例においても採用されている、表面抗原による分離技術を採用するのでは、本課題の達成は困難であると判断し、全く新しい技術手段による解決を試みた。すなわち、目的とするヒト未分化造血幹細胞の性状、特に細胞の材料への捕捉挙動に着目し、該細胞は有核細胞一般に共通した捕捉挙動を有するものの、脱着挙動は通常の有核細胞に比し、はるかに高い（脱着し易い）のではないかという仮定のもと種々検討を重ねた結果、有核細胞を捕捉するフィルターで目的とするヒト未分化造血幹細胞をきわめて高率に分離できるという驚くべき効果を見出し、本発明に至ったものである。

【0005】すなわち、本発明は、有核細胞を実質的に捕捉し、赤血球を実質的に通過するフィルターから回収された、CD45抗原陽性かつCD34抗原陰性かつ分化抗原陰性のヒト未分化造血幹細胞であり、また、本発明は、有核細胞を実質的に捕捉し、赤血球を実質的に通過するフィルターにCD45抗原陽性かつCD34陰性かつ分化抗原陰性の有核細胞を含む有核細胞含有液を導入し、次に該フィルターに液体を導入して該フィルターに捕捉されているCD45抗原陽性かつCD34抗原陰性かつ分化抗原陰性の有核細胞を回収するヒト未分化造血幹細胞の分離方法であり、また、本発明は、CD45抗原陽性かつCD34抗原陰性かつ分化系統陰性のヒト未分化造血幹細胞を分離回収する装置であって、液体流入口と液体流出口を有する容器に多孔質構造体からなる有核細胞捕捉材が充填されたフィルターであるヒト未分化造血幹細胞分離装置である。

【0006】以下本発明を詳細に説明する。本発明で言う有核細胞とは、細胞内に核を有する細胞のことを言い、具体的には白血球、顆粒球、好中球、好酸球、好塩基球、骨髄球、赤芽球、リンパ球、Tリンパ球、Bリンパ球、単球、造血幹細胞、造血前駆細胞等があげられる。

【0007】また、本発明で言う有核細胞を実質的に捕捉し、赤血球を実質的に通過するフィルターとは、例えば、有核細胞は実質的に捕捉し、赤血球は実質的に通過する材料を液体流入口と液体流出口を有する容器に充填したものがあげられる。有核細胞は実質的に捕捉し、赤血球は実質的に通過する材料は、通常用いられている細胞捕捉材であればいかなる材料も使用できるが、成形成性、滅菌性や細胞毒性が低いという点で好ましいものを例示すると、ポリエステル、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、アクリル樹脂、ナイロン、ポリカーボネート、ポリウレタン等の合成高分子、セルロース、酢酸セルロース、キチン、キトサンアルギン酸塩等

(3) 000-166541 (P2000-166541A)

の天然高分子、ハイドロキシアパタイト、ガラス、アルミナ、チタニア等の無機材料、ステンレス、チタン、アルミニウム等の金属があげられる。

【0008】これらの捕捉材は、このままでも用いることができるが、細胞の選択的通過性を高める等の目的で必要に応じ表面改質を施したものでよい。例えば、血小板通過性を高めるには、WO87/05812公報で提案されている非イオン性親水基と塩基性含窒素官能基を有するポリマーのコートによる方法等があげられる。

【0009】捕捉材の形状としては、粒状、繊維塊、織布、不織布、スポンジ状多孔質体、平板等があげられるが、体積あたりの表面積が大きいという点で、粒状、繊維塊、織布、不織布、スポンジ状多孔質体が好ましく、また、製造性、流れ性の点から不織布とスポンジ状多孔質体がより好ましい。不織布の場合、通常、繊維径は1.0 μ m以上30 μ m以下であり、好ましくは1.0 μ m以上20 μ m以下であり、さらに好ましくは1.5 μ m以上10 μ m以下である。1.0 μ m未満では、目的細胞であるCD45抗原陽性かつCD34抗原陰性かつ分化抗原陰性のヒト未分化造血幹細胞が強く捕捉されてしまい、回収困難となる可能性があり好ましくない。30 μ mを超えると、CD45抗原陽性かつCD34抗原陰性かつ分化抗原陰性のヒト未分化造血幹細胞は不織布に捕捉されず素通りする可能性が高くなる。いずれの場合でも回収率の低下につながるおそれがあるので好ましくない。また、スポンジ状構造体の場合、孔径は通常2.0 μ m以上30 μ m以下であり、好ましくは2.5 μ m以上25 μ m以下であり、さらに好ましくは3.0 μ m以上20 μ m以下である。2.0 μ m未満では流れ性が著しく劣り、通液自体が困難になるおそれがあり、また、25 μ mを超えるとCD45抗原陽性かつCD34抗原陰性かつ分化抗原陰性のヒト未分化造血幹細胞の捕捉率の低下を招くので好ましくない。

【0010】有核細胞は実質的に捕捉し赤血球は実質的に通過する材料を充填する容器の材質としては、成型性、滅菌性や細胞毒性が低いという点で好ましいものを例示すると、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、アクリル樹脂、ナイロン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリアクリルアミド、ポリウレタン、塩化ビニル等の合成高分子、ハイドロキシアパタイト、ガラス、アルミナ、チタニア等の無機材料、ステンレス、チタン、アルミニウム等の金属があげられる。

【0011】本発明で言う「有核細胞を実質的に捕捉し」とは、有核細胞含有液中の有核細胞を60%以上捕捉することを言い、また、「赤血球を実質的に通過する」とは、有核細胞含有液中の赤血球を60%以上通過することを言う。また、本発明で言う有核細胞含有液とは、例えば、骨髓、臍帯血（臍帯血管だけでなく胎盤血管から採取されたものも含む）、末梢血（顆粒球コロニー刺激因子等の造血因子を投与して採血されたものも含む）およびこれらに遠心分離等何らかの処理を施したものがあげられる。なお、本発明者らの経験では、臍帯血を比重遠心により単核球画分としたものが良い結果が得られている。また、何らかの処理とは凍結解凍も含む。

【0012】本発明において、前記細胞捕捉手段に導入して捕捉されている目的細胞であるCD45抗原陽性かつCD34抗原陰性回収必要細胞を回収する液体は、生理的溶液であればいかなるものも使用可能であるが、幾つか例示すると、生理食塩水、D-PBSやHBSSなどの緩衝液、RPMI 1640などの培地があげられる。これらの生理的溶液に、細胞保護、栄養補給、凍結保存時の凍害防止、粘度向上（回収率の向上に有効な場合がある）等の目的で必要に応じ、EDTA、デキストラン、ヒドロキシエチルデンプン、ジメチルスルホキシド、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、グルコース、サッカロース、トレハロース等を添加してもよい。なお、本発明者らの経験では、ヒト血清アルブミンおよびEDTA加D-PBSで良好な結果が得られている。

【0013】

【発明の実施の形態】以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明は、これらにより限定されるものではない。

【実施例1】① 細胞分離器

容器外寸（縦×横×厚み）41×41×18mmで液体流出口と液体流入口を対角線上に持つポリカーボネート製容器の入口側に平均繊維径2.3 μ mのポリエステル不織布18枚を、出口側に平均繊維径12 μ mのポリエステル不織布16枚を充填し細胞分離器とした。なお、充填密度は0.2g/cm³、有効濾過面積12.25cm²、有効濾過長12.4mmであった。

【0014】また、この細胞分離器に血小板通過性を付与する目的で、親水性ポリマーのコーティングを行った。すなわち、ヒドロキシエチルメタクリレート・ジメチルアミノエチルメタクリレート共重合体（ヒドロキシエチルメタクリレートとジメチルアミノエチルメタクリレートのモル比=97:3）の1%エタノール溶液を該フィルターの入口側から通液した後、窒素ガスを通して乾燥させた。

【0015】② 細胞分離操作

臍帯血を公知のFicoll-Hypaque比重遠心分離により単核球画分に分離した。得られた単核球画分を0.1%ヒト血清アルブミン加EDTA-DPBS 200ml（以後A液と呼ぶ）に再浮遊させ、原料細胞液とした。この原料細胞液を200mlの血液バッグに移した。この血液バッグを、途中に細胞回収用バッグ5が接続した三方活栓4とメッシュチャンバー3を有するチューブで、①で作製した細胞分離器1の入口側に接続した。細胞分離器1の出口側は、途中に回収用シリンジ接続用の三方活栓6を有するチューブでドレンバッグ7を接続した。原料血液バッグ2中の有核細胞含有液を約

(4) 000-166541 (P2000-166541A)

60cmの落差で細胞分離器に通液し、細胞分離器1から流出する微量の赤血球を含む液体をドレーンバッグ7に排液した。次に、三方活栓6にA液30mlを入れた30mlディスポーザブルシリンジを接続し、三方活栓6をシリンジと細胞分離器のみが連通する方向に回し、また、三方活栓4を細胞分離器1と細胞回収用バッグ5のみが連通する方向に回した後、シリンジを押して細胞分離器内に捕捉されている細胞を細胞回収用バッグ5に回収した。

【0016】分析

有核細胞数は自動血球計算機にて測定、未分化造血幹細胞はフローサイトメトリー法により、CD2、3、14、16、19、20、33、34、41、56、GlycophorinA陰性、CD45陽性の細胞群を定量することで行なった。なお、濃縮率、回収率の算出方法は以下のとおりである。

濃縮率(%) = $100 \times \frac{\text{当該細胞陽性率}}{\text{原料細胞液中の当該細胞陽性率}}$

回収率(%) = $100 \times \frac{\text{回収後当該細胞数}}{\text{原料血液中の細胞数}}$

【0017】結果

細胞分離前の未分化造血幹細胞陽性率は濃縮率0.74%であった。分離後の当該細胞の陽性率は50.2%と、分離操作により高度に当該細胞が濃縮されていた。濃縮率は67.83%となった。また、回収率42.8%であった。分離操作に要した時間は、約10分と極めて短時間であった。

【0018】

【発明の効果】以上示したように、本発明によれば、安価でかつ簡便・短時間操作でヒト未分化造血幹細胞を分離することができる。

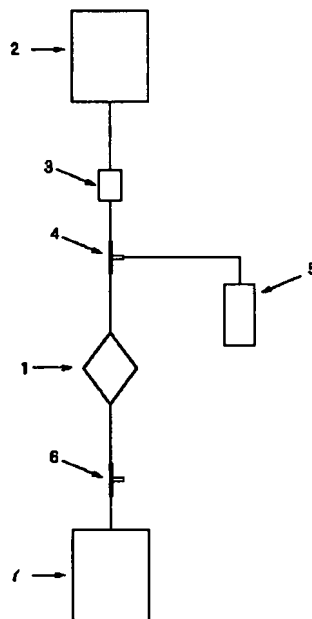
【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1で用いた細胞分離回路システムの模式図である。

【符号の説明】

- 1 細胞分離器
- 2 血液バッグ
- 3 メッシュチャンバー
- 4 三方活栓
- 5 細胞回収用バッグ
- 6 三方活栓
- 7 ドレーンバッグ

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 中村 嘉彦
東京都渋谷区富ヶ谷2丁目28番地4号 学
校法人 東海大学内

!(5) 000-166541 (P2000-166541A)

Fターム(参考) 4B029 AA07 AA27 BB11 CC01 FA02

FA11

4B065 AA93X AA94X BC42 BD18

CA44

4D019 AA03 BA01 BA02 BA04 BA06

BA12 BA13 BB02 BB03 BB07

BB10 BB12 BB13 BC13 BD01